

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-097694

(43)Date of publication of application : 20.04.1993

(51)Int.Cl.

A61K 37/02  
A61K 31/725  
A61K 37/24  
A61K 37/26  
A61K 37/30  
A61K 37/34  
A61K 37/38  
A61K 37/40  
A61K 37/465  
A61K 37/54  
A61K 37/66  
A61K 47/36  
A61K 47/38  
A61K 47/42

(21)Application number : 04-085092

(71)Applicant : DENKI KAGAKU KOGYO KK

(22)Date of filing : 09.03.1992

(72)Inventor : MIYOSHI TERUZO  
MIMURA SHUJI  
MITSUNO TOORU

(30)Priority

Priority number : 403 6767

Priority date : 08.03.1991

Priority country : JP

## (54) PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE PREPARATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject preparation having highly improved therapeutic action, drug delivery action, stability, etc., and good processability by compounding a physiologically active peptide exhibiting antiviral activity, anticancer activity, etc., with hyaluronic acid and a high polymeric material.

CONSTITUTION: The objective preparation is composed of (A) a physiologically active peptide (preferably, superoxide dismutase, epidermal cell growth factor, tumor necrosis factor, interferon, etc.), (B) hyaluronic acid (salt) and (C) a high polymeric material (e.g. gelatin, albumin, chitin, etc.) capable of administering to a living body like the component (B). Hyaluronic acid derived from a microorganism of the genus Streptococcus is preferable as it is homogeneous, higher polymeric and highly pure. It is preferable to use the component (C) 0.1-1.5 times as much as the component (B).

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

16.12.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against  
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-97694

(43)公開日 平成5年(1993)4月20日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 37/02		8314-4C		
31/725	A G A	8314-4C		
37/24		8314-4C		
37/26		8314-4C		
37/30		8314-4C		

審査請求 未請求 請求項の数 6(全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-85092	(71)出願人	000003296 電気化学工業株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目4番1号
(22)出願日	平成4年(1992)3月9日	(72)発明者	三好 照三 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化 学工業株式会社総合研究所内
(31)優先権主張番号	特願平3-67674	(72)発明者	三村 修治 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化 学工業株式会社総合研究所内
(32)優先日	平3(1991)3月8日	(72)発明者	満野 徹 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化 学工業株式会社総合研究所内
(33)優先権主張国	日本(JP)	(74)代理人	弁理士 齊藤 武彦 (外1名)

(54)【発明の名称】 生理活性ペプチド製剤

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 生理活性ペプチド含有製剤として臨床応用に適したものを提供する。

【構成】 生理活性ペプチドにヒアルロン酸と高分子物質を配合することにより改良された新しいタイプの医薬用製剤が得られる。

【効果】 本方法によって製造された医薬用製剤中では生理活性ペプチドとヒアルロン酸との複合体が形成されており、その為該ペプチドの治癒効果、製剤の安定性や薬剤放出性が著るしく向上し、更に製剤としての加工性も改善される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 生理活性ペプチド（但し、トランスフォーミング成長因子及び蛋白分解酵素阻害剤を除く）及びヒアルロン酸またはヒアルロン酸の非毒性塩及び、ヒアルロン酸またはその非毒性塩と共に生体に投与しうる高分子物質とからなることを特徴とする生理活性ポリペプチド製剤。

【請求項2】 該高分子物質が高分子物質類のなかから選ばれた1種又は2種以上のものである請求項1に記載の製剤。

【請求項3】 生理活性ペプチドが、スーパーオキシドジムスターゼ（SOD）、上皮細胞成長因子（EGF）、線維芽細胞成長因子（FGF）、副甲状腺ホルモン、副腎皮質ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン放出因子、レニン、アンジオテンシン、血液凝固因子、ヒト成長ホルモン、カルシトニン、性腺ホルモン、性腺刺激ホルモン、インシュリン、バソプレッシン、オキシトシン、ソマトスタチン、セクレチン、ガストリン、ガストリン分泌ペプチド、胃酸分泌抑制ペプチド、モチリン、造血因子、エリスロポエチン、ティッシュ・プラスミノゲン・アクチベーター（tPA）、ウロキナーゼ、プロウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、トロンボモジュリン、プロティンC、ヒルジン、コロニー刺激因子（G-CSF、GM-CSF、M-CSF）、インシュリン様成長因子（IGF）、肝実質細胞成長因子（HGF）、骨形成因子（BMF）、神経成長・栄養因子、ナトリウム利尿ペプチド、幹細胞増殖因子、血小板増殖因子、免疫抑制剤、非特異的免疫賦活剤、胸腺細胞活性化因子（TAF）、インターロイキン、腎臓成長因子、腫瘍壊死因子（TNF- $\alpha$ 及び $\beta$ ）、及びインターフェロン（IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 及びIFN- $\gamma$ ）から選ばれた1種又は2種以上のものからなる請求項1に記載の製剤。

【請求項4】 該ヒアルロン酸またはその非毒性塩と共に生体に投与しうる高分子物質が、アテロコラーゲン、ゼラチン、アルブミン、フィブリン、フィブリノーゲン、ポリリジン、ポリグルタミン酸等の蛋白質及びキチン、コンドロイチン硫酸、コロミン酸又はそれらの脱アセチル化物、デキストラン、シクロデキストラン、DEAE-デキストラン、イヌリン、ラミナラン等の多糖類及びポリ乳酸、ポリグリコール酸又はそれらのコポリマーあるいはヘテロポリマー、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシビニルポリマー、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース等の合成高分子から選ばれたものである請求項1に記載の製剤。

【請求項5】 該製剤が、固体、液体又はゲル状の半液体の投与形態のものである請求項1に記載の製剤。

【請求項6】 該製剤が、含有される生理活性ペプチドに応じて、抗ウイルス剤、抗癌剤、創傷治療剤、抗炎症剤又は骨関連疾患治療剤として使用されるものである請

求項1に記載の製剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、生理活性ペプチド製剤に関し、ヒアルロン酸またはその非毒性塩と高分子物質とを含有する臨床上的応用に適した製剤に関する。また、特に癌およびウィルス性疾患等の治療に有用なインターフェロン（IFN）を含有する製剤に関する。

## 【0002】

10 【従来技術】 近年種々な生理活性ペプチド類に関する研究が活発に行われ、その作用機序等が明らかになるとともに新規医薬品の開発へと進展してきている。しかし生理活性ペプチド類の多くは、生体内での効果持続時間は短く、有効濃度を維持することは極めて困難である。そのため生理活性ペプチド類を臨床に用いる場合、高価な薬剤を出来る限り少量で有効性を発揮させ、かつ投与回数も少なく一定濃度に維持し長時間効果が持続しうべく投与形態の検討がなされてきた。ヒアルロン酸を含有する医薬製剤としては、ヒアルロン酸と生理活性ペプチド類とを化学的に結合させてなる場合とヒアルロン酸と薬剤とを混合することからなる場合とがある。ヒアルロン酸と薬剤とを混合しているような特許出願の例としては、特開昭61-236732、同62-129226、特開平1-319427、同2-213、同2-231429等があるが実用上の効果等で課題が残されていた。

30 【0003】 例えば、IFNの場合には、特に生体内での効果持続時間が短く、有効濃度を維持することは極めて困難であり、IFNを臨床に用いる場合、高価なIFNを大量に用いる必要がある。このように大量に且つ頻繁にIFNを投与することは現実的ではないことなどから、薬剤をできるだけ少量で有効性を発揮できるようにすると共に、その投与回数も少なく一定濃度に維持して長時間効果が持続するようなものとするのが強く求められている。このような目的のために、例えば、インターフェロンをリボソーム封入【特開昭63-502117】、コラーゲン包埋【米国特許第4,855,134】および抗体結合【特開昭60-502104】させて、血中半減期を増加させる試みがなされているが、血中半減期の長さ、抗原性及び医薬としての安全性に対して十分に満足できるものではなかった。

## 【0004】

【課題の解決】 本発明は、抗ウイルス作用、抗癌作用、創傷治療作用、抗炎症作用又は骨関連疾患治療作用を有する生理活性ペプチドと、ヒアルロン酸またはヒアルロン酸の非毒性塩と、ヒアルロン酸またはその非毒性塩と共に生体に投与しうる高分子物質とからなる医薬製剤を提供することからなる。

50 【0005】 本発明者らは、生理活性ペプチド製剤、特に、スーパーオキシドジムスターゼ（SOD）、上皮細

胞成長因子 (EGF)、線維芽細胞成長因子 (FGF)、インターロイキン1 (IL-1)、及びインターフェロン (IFN) のいずれかを含有する生理活性ペプチド製剤の改良を種々試みた結果、ヒアルロン酸を該製剤中に加えることにより、該生理活性ペプチド製剤単独を用いる場合に比して優れた特性を得られることを見出した。

【0006】特に、こうして得られた製剤は、優れた治癒効果、優れた薬剤放出効果、優れた安定性などの作用効果が期待できる。

【0007】更に本発明者らは、このような知見に基づいて研究を進め、スーパーオキシドジムスターゼ (SOD)、上皮細胞成長因子 (EGF)、線維芽細胞成長因子 (FGF)、副甲状腺ホルモン、副腎皮質ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン放出因子、レニン、アンジオテンシン、血液凝固因子、ヒト成長ホルモン、カルシトニン、性腺ホルモン、性腺刺激ホルモン、インシュリン、バソプレッシン、オキシトシン、ソマトスタチン、セクレチン、ガストリン、ガストリン分泌ペプチド、胃酸分泌抑制ペプチド、モチリン、造血因子、エリスロポエチン、ティッシュ・プラスミノゲン・アクチベーター (tPA)、ウロキナーゼ、プロウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、トロンボモジュリン、プロティンC、ヒルジン、コロニー刺激因子 (G-CSF、GM-CSF、M-CSF)、インシュリン様成長因子 (IGF)、肝実質細胞成長因子 (HGF)、骨形成因子 (BMF)、神経成長・栄養因子、ナトリウム利尿ペプチド、幹細胞増殖因子、血小板増殖因子、免疫抑制剤、非特異的免疫賦活剤、胸腺細胞活性化因子 (TAF)、インターロイキン、腎臓成長因子、腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$  及び  $\beta$ )、及びインターフェロン (IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  及び IFN- $\gamma$ ) から選ばれた1種又は2種以上のものからなる生理活性ペプチド (但し、トランスフォーミング成長因子及び蛋白分解酵素阻害剤を除く) 製剤中にヒアルロン酸を加えることにより、該生理活性ペプチド製剤単独を用いる場合に比して優れた特性を得られることを見出した。更に本発明者らは、このような知見に基づいて研究を進め、該生物活性ペプチドとヒアルロン酸との配合製剤中に、更に高分子物質の1種又は2種以上を適量共存させることにより、一層優れた特性が得られることを見出した。

【0008】特に、該生理活性ペプチド、ヒアルロン酸、及び高分子物質を互いに選択することにより、複合体を形成させることができ、こうして得られる複合体はさらに優れた特性を示すことを見出した。このように複合体を形成したものは、その利用性などが優れたり、持続性が増すなどの大変に優れたものである。かくして得られるヒアルロン酸と高分子物質とからなる新しいタイプの複合体製剤は、単にヒアルロン酸を配合した製剤に比し、より優れた治癒効果、優れた薬剤吸収性、優れた

薬剤放出性、優れた薬剤安定性、優れたターゲッティング効果に加えて、製剤製造加工上の様々な利点が期待しうるものである。これらの特性の代表的なものとしては、作用効果の持続時間の延長、効果発現パターンの調節製剤の保存、安定性の増加、製剤の分解変質の防止、などがあげられよう。

【0009】本発明で用いられる生理活性ペプチドとしては、ホルモン、酵素、リンホカイン、成長因子等の動物組織より抽出精製されたり、細胞培養あるいは遺伝子組換え技術により得られたペプチド鎖を有する生理活性物質を指す。但し、トランスフォーミング成長因子及び蛋白分解酵素阻害剤は除かれる。

【0010】本発明で用いられる生理活性ペプチドとしては、スーパーオキシドジムスターゼ (SOD)、上皮細胞成長因子 (EGF)、線維芽細胞成長因子 (FGF)、副甲状腺ホルモン、副腎皮質ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン放出因子、レニン、アンジオテンシン、血液凝固因子、ヒト成長ホルモン、カルシトニン、性腺ホルモン、性腺刺激ホルモン、インシュリン、バソプレッシン、オキシトシン、ソマトスタチン、セクレチン、ガストリン、ガストリン分泌ペプチド、胃酸分泌抑制ペプチド、モチリン、造血因子、エリスロポエチン、ティッシュ・プラスミノゲン・アクチベーター (tPA)、ウロキナーゼ、プロウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、トロンボモジュリン、プロティンC、ヒルジン、コロニー刺激因子 (G-CSF、GM-CSF、M-CSF)、インシュリン様成長因子 (IGF)、肝実質細胞成長因子 (HGF)、骨形成因子 (BMF)、神経成長・栄養因子、ナトリウム利尿ペプチド、幹細胞増殖因子、血小板増殖因子、免疫抑制剤、非特異的免疫賦活剤、胸腺細胞活性化因子 (TAF)、インターロイキン、腎臓成長因子、腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$  及び  $\beta$ )、及びインターフェロン (IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  及び IFN- $\gamma$ ) から選ばれた1種又は2種以上のものからなる生理活性ペプチド (但し、トランスフォーミング成長因子及び蛋白分解酵素阻害剤を除く) が挙げられる。本発明で用いられる生理活性ペプチドとしては、特に好ましいものは、スーパーオキシドジムスターゼ (SOD)、腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$  及び  $\beta$ )、インターフェロン (IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  及び IFN- $\gamma$ )、上皮細胞成長因子 (EGF)、線維芽細胞成長因子、インターロイキン1等のインターロイキン、コロニー刺激因子 (G-CSF、GM-CSF、M-CSF) などがあげられる。本発明で有利に生理活性ペプチドとして、胃酸分泌抑制ペプチド、モチリン、造血因子、エリスロポエチン、ティッシュ・プラスミノゲン・アクチベーター (tPA)、ウロキナーゼ、プロウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、トロンボモジュリン、プロティンC、ヒルジン、インシュリン様成長因子 (IGF)、肝実質細胞成長因子 (HGF)、骨形成因

子 (BMF)、神経成長・栄養因子、ナトリウム利尿ペプチド、幹細胞増殖因子、血小板増殖因子、免疫抑制剤、非特異的免疫賦活剤、胸腺細胞活性化因子 (TAF)、腎臓成長因子等が用いられる。本発明では、生理活性ペプチドとして、副甲状腺ホルモン、副腎皮質ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン放出因子、レニン、アンジオテンシン、血液凝固因子、ヒト成長ホルモン、カルシトニン、性腺ホルモン、性腺刺激ホルモン、インシュリン、バソプレッシン、オキシトシン、ソマトスタチン、セクレチン、ガストリン、ガストリン分泌ペプチド等も用いられる。これら生理活性ペプチドは、天然物由来のものであっても、化学合成されたものあるいは部分的に修飾されたもの、あるいは遺伝子組換え法によって得られたものであってよい。特に遺伝子組換え法で得られたものが好ましい。

【0011】IFNは、リンパ球や線維芽細胞が産生する生理活性物質で抗ウイルス作用や抗癌作用を示すことが知られてきている。このIFNには、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、およびIFN- $\gamma$ の3種が存在することが知られ、細胞培養技術および遺伝子組換えなどの進歩により大量に入手しうようになってきた。

【0012】このIFNは多発性骨髄腫、腎癌、膠芽腫、皮膚悪性黒色腫、B型肝炎等の治療薬として、使用が開始され、さらには非A非B型肝炎、エイズ、その他の癌やリウマチ等の治療薬としての期待がかけられている。

【0013】本発明に従えば優れた製剤が得られることから、これら用途以外の抗ウイルス作用並びに抗腫瘍作用、さらには関節炎治療作用などへの応用も期待しうる。本発明においてはこのIFNは、種々のものが用い

ることができる。

【0014】更に、本発明に従えば優れた製剤が得られることから、その用途範囲を拡大しての応用も期待しうる。本発明においては、特に抗原性及び早い血中消失速度の問題の指摘されている遺伝子組換え手法により得られたものについて、優れた結果が望むことができる。

【0015】ヒアルロン酸はN-アセチルグルコサミンとグルクロン酸のくり返し単位からなる重合体であり、自然界に広く存在し、多くの哺乳類中に見出される。例えば、鶏冠から抽出されたヒアルロン酸が、変形性膝関節症の治療剤として使用され、また、ある種のバクテリア、例えばストレプトコッカス属によって産生されてヒアルロン酸も、医薬品として開発されつつある。本発明に用いるヒアルロン酸は、遊離の形でよく又はその塩でもよく、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩等の非毒性塩が挙げられる。本発明に用いるヒアルロン酸としては、特に起源を問わない。

【0016】しかしながら、上記のようにある種のバクテリア、例えばストレプトコッカス属により産生されるヒアルロン酸は、比較的均一なより高分子形態のものが

高い純度で得られることから好ましい。

【0017】特に、本発明の製剤においては、薬剤の効果持続時間とその使用ヒアルロン酸の分子量との間には密接な関係が認められ、ヒアルロン酸のうち高純度のものであって、インターフェロン以外のものにあつてはその分子量が20~300万程度のものが好ましく、場合によっては50万~300万程度のものが特に好ましい。またインターフェロンにあつては、好ましくは50万~300万程度のものであり、場合によっては100万~300万程度のものが特に好ましい。このように、その使用ヒアルロン酸として特定の分子量のものを使用することにより、本発明の製剤では種々の医薬製剤として望ましい特性のものを得ることができる。

【0018】ヒアルロン酸又はその塩は、該生物活性ペプチドに対して種々の量で使用することができる。ヒアルロン酸又はその塩の濃度はその分子量にもよるが、製剤あたり0.1~50重量%の範囲で用いることができる。また、本発明において、特に好ましいヒアルロン酸塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等があげられ、薬学的に安定であるものが好ましい。

【0019】本発明に従い、上記生物活性ペプチドとヒアルロン酸又はその非毒性塩とからなる配合剤に、ヒアルロン酸又はその塩と共に生体投与することが可能な高分子物質をさらに配合した医薬製剤が得られる。このような高分子物質はその1種又は2種以上、例えば3種又は4種を配合することができる。このような配合は、生物活性ペプチドに応じて選択することができる。

【0020】該高分子物質としては、アテロコラーゲン、ゼラチン、アルブミン、フィブリン、フィブリノーゲン、ポリリジン又はポリグルタミン酸などの天然由来又は人工的に合成された蛋白質、あるいはそれらの加水分解又は修飾物など、キチン、コンドロイチン硫酸、コロミン酸又はそれらの脱アセチル化物、デキストラン、DEAE-デキストラン、シクロデキストラン、イヌリン、ラミナラン等の多糖類、さらにポリ乳酸、ポリグリコール酸又はそれらのコポリマーあるいはヘテロポリマー、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロース等の合成高分子などがあげられる。

【0021】該高分子物質は、目的に応じて種々の量で用いることができ、例えばその種類にもよるがヒアルロン酸に対し、10~200重量%配合することができる。例えば高分子物質は、それが蛋白質の場合、ヒアルロン酸に対し、0.1~1.5倍の量、多糖類の場合ヒアルロン酸に対し、0.1~1.5倍の量、合成高分子の場合ヒアルロン酸に対し0.1~1.5倍の量、配合すると優れた結果が得られうる。特に、これら高分子物質はヒアルロン酸と相互作用して、効果発現に望ましい働きをなす。例えば、これら高分子物質はヒアルロン酸

10

20

30

40

50

と相互作用して、より強固な高分子マトリックスを形成したり、又特に蛋白質の場合にはヒアルロン酸と強く結合し、ヒアルロン酸に曳糸性をもたらすような粘性等の物性変化をきたしたりすることにより薬剤の効果発現保持時間、発現パターンを調節したり薬剤の安定性を改善する働きがある。顆粒剤、錠剤もしくは液剤などの使用形態に応じ適当な高分子物質と製造条件が選択されるが、一般的には、高分子物質の使用量はヒアルロン酸に対し0.1~1.5倍量で複合体形成pHは3~10、好ましくは4~8である。

【0022】インターフェロンについての製剤は、より良好な結果を与えるものであり、好ましい。このような良好な結果としては、前記したように高い治療効果が達成されたり、幅広い製剤形態がとり得たり、薬剤安定性が得られたり、生体内持続性が得られたり、注射の際の無痛性が達成されたり、製剤加工性が改善されたり、バイオアベイラビリティが改善されたりすることがあげられる。

【0023】本発明においては、生理活性ペプチドに対して、ヒアルロン酸はその目的に応じて種々の量配合して用いることができ、また高分子物質はその種類にもよるがこれまたその目的に応じて種々の量配合して用いることができる。例えば、インターフェロンを用いた場合、インターフェロンは $10^5 \sim 10^{12}$ 単位の量、さらに好ましくは $10^6 \sim 10^{10}$ 単位の量を製剤中に含めるようにできる。それに対し、ヒアルロン酸又はその非毒性塩は製剤あたり剤形に応じて種々の量用いることができ、例えば0.1~50重量%、さらに好ましくは0.5~10重量%の量用いることができる。また、ヒアルロン酸又はその非毒性塩は、製剤あたり、液体の剤形の場合0.1~10重量%、固体の場合0.5~50重量%、半液体の場合0.5~10重量%を例示することができる。また、高分子物質は、種々のものが種々の量で用いることができるが、例えばヒアルロン酸に対し、0.1~1.5重量%の量、さらに好ましくは、0.5~1.2重量%の量加えると好ましい結果が得られる。

【0024】本発明の配合物は、固体または液体の形態、さらにはゲル状の半液体の形態にすることができ、固体または液体の医薬用担体または賦形剤、安定剤等を添加して適切な製剤形態とすることができる。このような添加物のうちには、炭素数2~8の水溶性脂肪酸カルボン酸、適当な界面活性剤、電解質、防腐剤、酸化防止剤などがあげられる。この他の添加剤としては、pH調整剤、基剤、ゲル安定化剤、湿潤剤等を適宜選択しうる。

【0025】このカルボン酸としては、例えばモノカルボン酸、ジカルボン酸、トリカルボン酸等があげられる。モノカルボン酸としては、低級脂肪酸、1~7個の水酸基を有するモノカルボン酸などがあげられ、ジまたはトリカルボン酸としてはアルカン鎖中に任意に2~3

個のカルボキシル基を有するものがあげられ、それらはまた任意に1~3個の水酸基を含有してよい。さらにこれらカルボン酸はアミノ基を有することもできる。これらカルボン酸の具体例としては、酢酸、プロピオン酸、乳酸、グルコン酸、グルクロン酸、マロン酸、コハク酸、クエン酸、アスコルビン酸、酒石酸、リング酸、グルタル酸、アスパラギン酸、グルタミン酸などがあげられ、これらのものは部分的に塩とされたり、エステル化されたりされることもできる。

10 【0026】適当な界面活性剤としては、医薬添加剤として許容されるものがあげられ、例えばソルビタンモノパルミテート、ソルビタントリステアレート、ソルビタンセスキオレエートなどのソルビタン脂肪酸エステル類；ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンモノオレエートなどのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類；グリセリンモノステアレート、グリセリン・ヤシ油脂肪酸エステル、グリセリンモノオレエート、アセチル化グリセリンモノステアレート、アセトアセチル化グリセリンモノステアレートなどのグリセリン脂肪酸エステル類；プロピレングリコールモノラウレートなどのプロピレングリコール脂肪酸エステル類；ポリオキシエチレングリセリンモノステアレートなどのポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル類；ポリオキシエチレンモノステアレート、ポリオキシエチレンオレエートなどのポリオキシエチレン脂肪酸エステル類；ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテルなどのポリオキシエチレンアルキルエーテル類；ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルなどのポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル類；ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンラノリンなどのポリオキシエチレン誘導体類；ポリオキシエチレンステアリアルアミン、ポリオキシエチレンオレイン酸アミンなどのポリオキシエチレンアルキルアミンおよびアミド類；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸トリエタノールアミンなどのアルキル硫酸エステル塩およびポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸エステル塩類；ピリドキシン脂肪酸エステル類；アスコルビルジパルミテートなどのアスコルビン酸脂肪酸エステル類；ショ糖ラウレートなどのショ糖脂肪酸エステル類；リジウムラウレートなどのカルボン酸塩類；ラウリルリン酸ナトリウム、ポリオキシエチレンセチルエーテルリン酸ナトリウムなどのアルキルリン酸エステルおよびポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸エステル類；ヤシ油脂肪酸モノグリセリド硫酸エステルナトリウムなどの硫酸エステル塩類；大豆レシチン、ケファリン、リポイノシトールなどのリン脂質類；セネガサポニンなどのサポニン類、ウルソデオキシコール酸ナトリウム、グリココール酸ナトリウムなどのコー

20

30

40

50

ル酸およびその塩類などが挙げられ、これらの1種又は2種以上が用いられる。

【0027】 適当な電解質としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸ナトリウム、硫酸マグネシウムなどがあげられる。防腐剤としては、メチルパラベン、ソルビン酸、ベンジルアルコール、クロールブタノールなどがあげられる。

【0028】 適当な酸化防止剤としては、亜硫酸水素ナトリウム、ブチルヒドロキシアニソール、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、トコフェロールなどがあげられる。

【0029】 適当なpH調整剤としては、適当な酸、塩基または緩衝液などがあげられ、例えば水溶性脂肪族カルボン酸、無機酸、有機又は無機塩基があげられ、具体的には塩酸、ホウ酸、リン酸、硫酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液等があげられる。

【0030】 基剤のうち水性ゲル基剤としては、たとえば、トラガントガム、アカシアガム、カラヤガム、グアヤクガム、キサンタンガム等の天然ガム類、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリビニルメチルエーテル、カルボキシポリメチレン等のビニルポリマー、デンプン、ペクチン、アルギン酸ソーダなどがあげられる。

【0031】 またその他の基剤としては、カカオ脂、パーム油、パーム核油、ヤシ油、分画ココナッツ油、ラード、ウィテップゾール<sup>(R)</sup> などトリグリセリドを主体とする油脂類；ラノリン、還元ラノリンなどのロウ類；ワセリン、スクワレン、スクワランなどの炭化水素類；カプリン酸、ラウリン酸、ステアリン酸、オレイン酸などの中長鎖脂肪酸類；ラウリルアルコール、セタノール、ステアリルアルコール、オレイルアルコールなどの高級アルコール類；ステアリン酸ブチル、マロン酸ジラウリルなどの脂肪酸エステル類；トリオレイン、トリステアリンなどのグリセリン中長鎖カルボン酸エステル又はグリセリンアセト酢酸エステルなどのグリセリン置換カルボン酸エステル等のグリセリンエステル類；マクロゴール、セトマクロゴールなどのポリエチレングリコール類などがあげられ、これら1種又は2種以上が用いられる。

【0032】 本発明の製剤は通常の方法を適用することにより、その製造を行うことができる。例えば、液剤の場合、ヒアルロン酸又はその無毒性塩を含む溶液に、生物活性ペプチドを適当なpH調整剤等の入った溶液に溶解又は懸濁化したものを添加し、攪拌する。この場合、必要に応じて前記したような添加剤を加えることにより、最適なものとする事ができる。こうして得られた製剤は、さらに高分子物質を添加して、より良好な製剤とすることができ、特に複合体を形成せしめて大変に優れた製剤とすることができる。

【0033】 このようにして得られた溶液剤は、さらに任意にpH調整剤、防腐剤なども加えることができ、更に凍結乾燥したり、減圧下に液を濃縮したり、あるいは適当なゲル化剤を加えるなどして、固体あるいは粉末体にしたり、ゲル化物にすることができる。本発明に従えば、適宜必要に応じ再溶解、あるいは分散化处理することもでき、更には適宜に加熱あるいは冷却処理をして所望の製剤とすることができる。

【0034】 本発明の製剤は、剤型、主薬の種類、対象動物（例、マウス、ラット、ウシ、ウマ、人等の温血動物）、投与目的により変えることができるが、その1回投与量は有効量であればよく、例えば、約1mg～500mg/kg体重の範囲から適宜選択することができる。また投与回数も上記と同様に変えることができるが、週に1～4回から1日に1～3回の範囲で適宜選択しうる。

【0035】 本発明に従って得られた製剤は、優れた性質を示すが、特にIFN-ヒアルロン酸を有する製剤は、長期治療を必要とする癌及びウイルス疾患の治療にあっても望ましく用いられる。

【0036】 本発明に従って得られた製剤は、顆粒剤、錠剤もしくは液剤として、経鼻または経口投与することもできるし、皮膚などに塗布することもでき、注射剤として、静脈内投与、筋肉内投与あるいは皮下投与などを行うこともできる。注射剤としては粉末として用時調製して使用してもよい。

【0037】 特にインターフェロンについての製剤にあつては、成人に対し、1日量100～1,000mg投与するのが好ましいが、年令、症状により適宜増減することも可能である。前記1日量の本発明のインターフェロンの製剤は、1日1回投与することも可能だが、3日もしくは、7日に1回投与でも十分の効果が望めるものである。

【0038】 次に、本発明のIFNを含有する生理活性ペプチド製剤を製造する方法につきさらに説明する。すなわちヒアルロン酸又は無毒性塩を含む溶液にIFNを添加・攪拌し、ヒアルロン酸-IFN混合物を得る。必要に応じ高分子物質を添加し液体製剤として用いてもよい。更にこのものを濃縮あるいは添加物の濃度を増したり、あるいは組合せを選択することによりゲル状の半液体状にして使用してもよいし、又凍結乾燥などにより固体粉末化し用いることも可能で適用用途に応じ自由に選択できる。

【0039】

【実施例】 以下に実施例を掲げて本発明について具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。なお、以下の実施例等において、インターフェロン力価の測定はVSウイルスおよびヒト羊膜由来の株化細胞（FL細胞）を用い、細胞変性効果法により国際単位（I. U.）に換算した。

【0040】 実施例1



ヒト・インターフェロン- $\alpha$  (組換え型)  $1 \times 10^8$  単位をヒアルロン酸ナトリウム (平均分子量 210 万) 0.5 wt% 生理食塩水溶液 5 ml に添加し混合した。このものに脱アセチル化キチン (キトサン) (平均分子量 1000) 5% 水溶液 1 ml を添加混合し pH を 6.0 に 6 時間維持し、注射用 IFN・ヒアルロン酸複合体を得た。上記方法にて得られたインターフェロン- $\alpha$ ・ヒアルロン酸複合体 0.5 ml をラット (Wister 系、雄、体重 200 g、7 週令・日本チャールスリバー社) の大腿部の筋肉内に注射投与し、血中の力価を測定した。結果を第 1 図に示す。図 1 において-●-は、インターフェロン- $\alpha$ ・ヒアルロン酸複合体の、-○-は、対照としたインターフェロン- $\alpha$  単独の測定結果を示す。インターフェロン- $\alpha$ ・ヒアルロン酸複合体製剤は優れた特性を有している。

#### 【0041】実施例 2 (ゲル剤)

ヒアルロン酸ナトリウム (平均分子量 100 万) 1.5 wt% 生理食塩水溶液 10 ml にヒト・インターフェロン- $\beta$  (天然型)  $1 \times 10^8$  単位を混合後、アテロコラーゲン (シグマ社製) 0.5 g を添加、pH 調整後溶解した。このゲル状製剤は、経口投与剤として使用できる。この製剤は優れた特性を有している。

#### 【0042】実施例 3 (ゲル剤)

ヒアルロン酸ナトリウム (平均分子量 250 万) 1.5 wt% 生理食塩水溶液 100 ml にヒト EGF (組換え型)  $50 \mu\text{g}$  を混合後、アテロコラーゲン 5 g を添加、pH 調整後溶解した。こうして得られたゲル状製剤は、火傷の治療剤として使用される。

#### 【0043】実施例 4 (粉末剤)

無菌条件下ヒト Cu-Zn-SOD (組換え型) 1 mg を 30 ヒアルロン酸ナトリウム (平均分子量 150 万) 1 wt% 生理食塩水溶液 1000 ml に溶解後、ヒドロキシプロピ\*

\*ルセルロース 10 g を添加し、溶解させ、凍結乾燥した。乾燥物を粉末化し用時調製タイプの関節リウマチ注射用無菌製剤として使用される。

#### 【0044】実施例 5 (軟膏剤)

日本薬局方マクロゴール軟膏 840 g を軟膏板にとり、セタノール 50 g を軟膏板で練合し、次に IL-1 $\beta$  (組換え型) (ゼンザイム社) 1 mg、ヒアルロン酸ナトリウム (平均分子量 150 万) 10 g、ポリリジン 10 g および適当量の防腐剤を加え、最後に生理食塩水を加え 1000 g とし、よく練合し調製した。このものは、手術後の傷口や老人の床ずれの治療薬として使用される。

#### 【0045】実施例 6

実施例 1 のキトサンに代えて、ゼラチン、アルブミン、フィブリン、フィブリノーゲン、ポリリジン、ポリグルタミン酸、コンドロイチン硫酸、コロミン酸、デキストラン、シクロデキストラン、DEAE-デキストラン、イヌリン、ラミナラン、ポリ乳酸 (分子量: 5000)、ポリグリコール酸 (分子量: 10000) から選ばれた各々のうちのの一つを 1% 含有する生理食塩液を用いて同様に溶解液を得た。こうして得られた製剤は優れた作用を有している。

#### 【0046】実施例 7

牛赤血球由来 Cu-Zn-SOD (和光純薬) 500 U をヒアルロン酸ナトリウム (平均分子量 180 万) 0.6 wt% 生理食塩水溶液 5 ml に溶解後、ゼラチン (新田ゼラチン) 2 mg を添加して溶解した。得られた製剤における SOD の凍結乾燥における安定性をその前後で SOD の酵素活性を測定することで検討した。結果を第 1 表に示す。

#### 【0047】

【数 1】

$$\text{活性保持率} = \frac{\text{凍結乾燥後の SOD 活性}}{\text{凍結乾燥前の SOD 活性}} \times 100$$

#### 【0048】

【表 1】

製剤（混合物）	活性保持率（％）
SOD	90
SOD／ゼラチン	85
SOD／ヒアルロン酸	85
SOD／ヒアルロン酸／ゼラチン	100

【0049】SOD、ヒアルロン酸、ゼラチンの混合製剤は、他の製剤に比べて良好な活性保持効果を有していた。

#### 【0050】実施例8

マクロファージ・コロニー刺激因子（組換え型）1mgにヒト血清アルブミン10mgを加えヒアルロン酸ナトリウム（平均分子量160万）0.6wt%生理食塩水溶液10mlに溶解後凍結乾燥した。この製剤は、用時調製タイプの注射用抗癌剤として使用される。

#### 【0051】実施例9

腫瘍壊死因子のTNF- $\beta$ （組換え型） $1 \times 10^6$ 単位をヒアルロン酸ナトリウム（平均分子量180万）2.0wt%リン酸緩衝液（pH7.2）溶液3mlに添加し混合した。このものに脱アセチル化キチン（キトサン）

（平均分子量15万）2%塩酸溶液（0.05M）6mlを添加混合し、注射用TNF- $\beta$ ・ヒアルロン酸複合体を得た。上記方法にて得られたTNF- $\beta$ ・ヒアルロン酸複合体1.0mlをラット（Wister系、雄、体重200g、7週令・日本チャールスリバー社）の背部皮下に注射投与し、血中のTNF- $\beta$ 量を酵素免疫測定

法にて測定した。結果を第2図に示す。図2において●-は、TNF- $\beta$ ・ヒアルロン酸複合体の、-○-は、対照としたTNF- $\beta$ とヒアルロン酸の混合製剤の、-□-は、対照としたTNF- $\beta$ 単独の測定結果を示す。TNF- $\beta$ ・ヒアルロン酸複合体製剤は優れた特性を有している。

#### 【0052】

【発明の効果】本発明の製剤は、ヒアルロン酸に加えて高分子物質を添加することによりヒアルロン酸と複合体を形成せしめることができ、治療用薬剤として大変に優れている。さらに、その製剤としての加工性においても好ましい。

#### 【図面の簡単な説明】

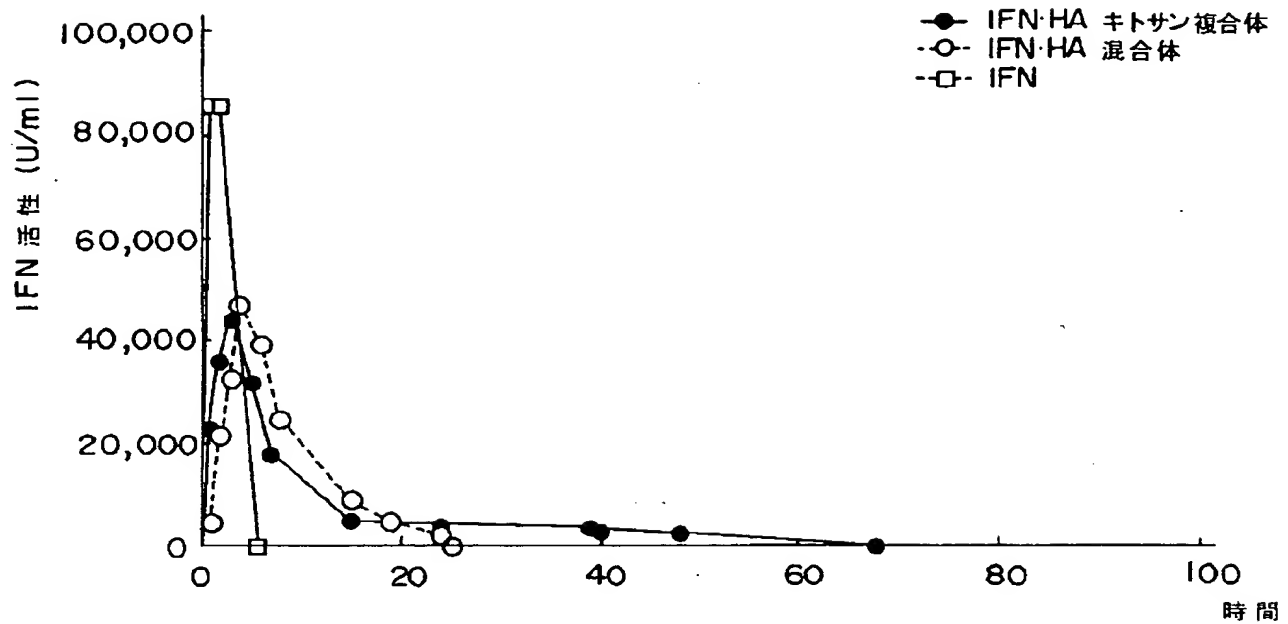
【図1】実施例1に示したインターフェロン- $\alpha$ ・ヒアルロン酸ナトリウム複合体の筋注におけるラット血清中のクリアランスの遅延効果を示す。

【図2】実施例2に示したTNF- $\beta$ ・ヒアルロン酸ナトリウム複合体の皮下投与におけるラット血清中でのクリアランスの遅延効果を示す。

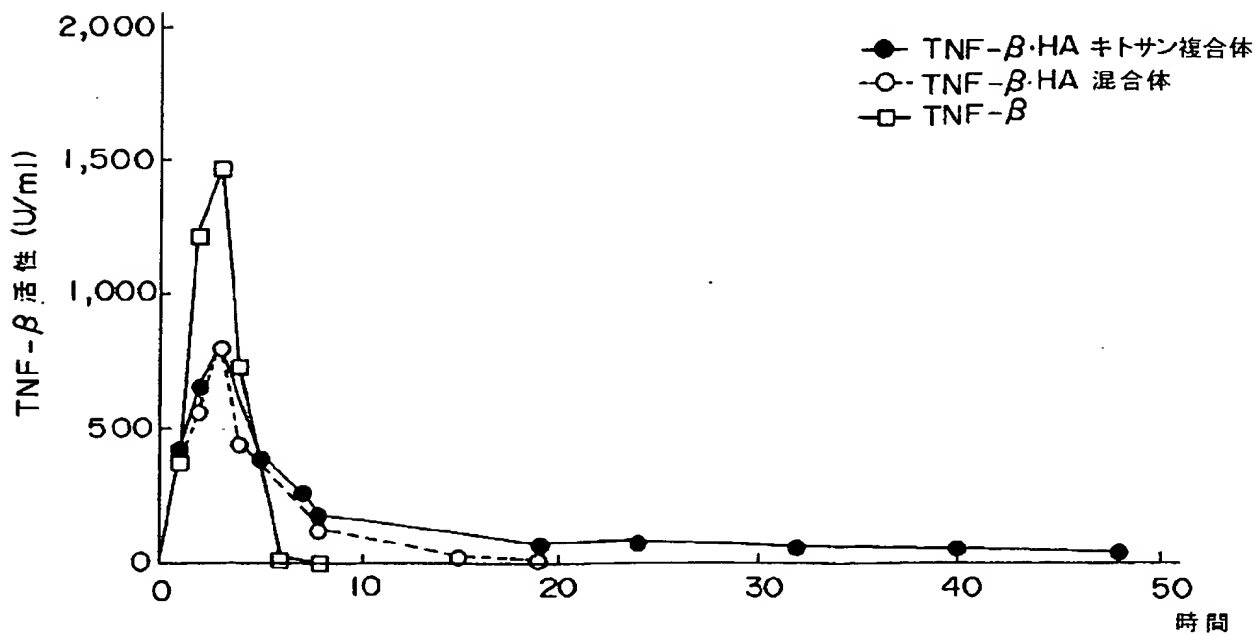
20

30

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

A 61 K 37/34

37/38

識別記号

庁内整理番号

8314-4C

8314-4C

F I

技術表示箇所

37/40		8314-4C
37/465		8314-4C
37/54		8314-4C
37/66	H	8317-4C
47/36	C	7329-4C
	H	7329-4C
47/38	C	7329-4C
47/42	C	7329-4C